

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

**Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.**

**Defects in the images may include (but are not limited to):**

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>B01D 15/08, G01N 30/48, B01J 20/22</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/38594</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 5. August 1999 (05.08.99)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP99/00473 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 26. Januar 1999 (26.01.99)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 03 415.6      29. Januar 1998 (29.01.98)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO. KG [DE/DE]; D-65926 Frankfurt am Main (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> BENGIS, Holger [DE/DE]; Bindingstrasse 3, D-60598 Frankfurt am Main (DE). SCHNELLER, Arnold [DE/DE]; Berliner Strasse 37, D-64409 Messel (DE). BÖHM, Gitta [DE/DE]; Im Burgfeld 243, D-60439 Frankfurt am Main (DE). AN- DERT, Doris [DE/DE]; Konrad-Adenauer-Ring 39, D-65428 Rüsselsheim (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, CA, CN, CZ, HU, JP, KR, NZ, PL, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
<b>(54) Title:</b> SEPARATION OF SUBSTANCE MIXTURES USING POLYSACCHARIDES <b>(54) Bezeichnung:</b> TRENNUNG VON STOFFGEMISCHEN UNTER EINSATZ VON POLYSACCHARIDEN  <b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to a method for separating substance mixtures by chromatography using spherical microparticles consisting of chemically and physically unmodified, water-insoluble, linear polysaccharides.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur chromatographischen Trennung von Stoffgemischen unter Einsatz von sphärischen Mikropartikeln aus chemisch und physikalisch unmodifizierten, wasserunlöslichen, linearen Polysacchariden.</p> <div style="text-align: center; margin-top: 50px;"><i>gemt AS</i> <i>DE 198 03415</i></div>		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## Beschreibung

### Trennung von Stoffgemischen unter Einsatz von Polysacchariden

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Trennung von Stoffgemischen, insbesondere Enantiomeren, unter Einsatz von sphärischen Mikropartikeln aus chemisch und physikalisch unmodifizierten, wasserunlöslichen, linearen Polysacchariden als Trennmateri-  
al.

Die Chromatographie ist eine effektive Methode zur vollständigen Trennung von Komponenten einer Mischung, insbesondere zur Auftrennung von Mischungen ähnlicher Verbindungen, z.B. von Stereoisomeren. Aufgrund des steigenden Interesses an reinen Enantiomeren für pharmazeutisch und biochemisch wirksame Substanzen und Pflanzenschutzmittel ist die chromatographische Trennung enantiomerer Verbindungen von besonderem Interesse. Für die Aufreinigung dieser Verbindungen werden ständig verbesserte Verfahren entwickelt und bessere Trennmateriale gesucht, insbesondere auf der Basis der Polysaccharide Cellulose und Stärke, zwei leicht zugänglichen und kostengünstigen Polymeren mit chiralen Atomen.

So schildert der Artikel Chromatographie 65, LaborPraxis, 730-738 (1990) die Verwendung von mikrokristalliner Tribenzoylcellulose mit Korngrößen von 10 bis 20 µm im Vergleich zu Triacetylcellulose als Sorbens für die Enantiomerentrennung in der Chromatographie. Beide Substanzen können für analytische und präparative Trennungen verwendet werden. Sie sind durch Derivatisierung von Cellulose zugänglich. Unmodifizierte Polymere kommen nicht zum Einsatz. Die Einführung kleinerer Korngrößen bis zu 5 µm, um Totvolumina und eine im Verlauf des Betriebs auftretende Verdichtung der Säule zu vermeiden, wird als wünschenswert beschrieben.

WO 95/05879 behandelt ebenfalls die Trennung von Enantiomeren durch Flüssigkeitschromatographie. Besondere Aufmerksamkeit wird hier der mobilen Phase zur Verbesserung der Trennleistung gewidmet. Als stationäre Phase werden

Carbamat-Derivate von Cellulose und Amylose und Ester-Derivate von Cellulose verwendet.

DE-A-43 17 139 beschreibt ein spezielles Verfahren zur Enantiomerentrennung von Inhalationsanästhetika mittels präparativer Gaschromatographie. Als stationäre Phase werden mit Estergruppierungen derivatisierte Cyclodextrine in Polysiloxanlösung auf porösem Trägermaterial (Chromosorb) verwendet. Um geeignetes Trennmateri-  
al zu erhalten, müssen die Cyclodextrine chemisch modifiziert, in Polysiloxan gelöst und auf einem geeigneten Trägermaterial fixiert werden.

In US 5,403,898 werden Cyclodextrinderivate enthaltende polymere Siloxane als chirale stationäre Phase in der analytischen und präparativen Gaschromatographie (GC), Chromatographie (LC) eingesetzt. Diese Peralkyl-Cyclodextrine werden chemisch an die Polysiloxane gebunden. Das verwendete Material wird also durch chemische Modifizierung der Cyclodextrine und anschließende chemische Fixierung an Polysiloxane erhalten.

In US 5,302,633 wird, um eine Unlöslichkeit der chiralen stationären Phase zu erreichen, ein Vinylderivat eines Polysaccharids (z.B. Cellulose) auf der Oberfläche eines porösen Trägers (z.B. Kieselgel) erst adsorbiert, dann polymerisiert. Eine zweite Variante ist die Copolymerisation eines Vinylgruppen enthaltenden porösen Trägers (z.B. modifiziertes Kieselgel) mit einem Vinylderivat eines Polysaccharids. Auch hier sind chemische Modifizierungen notwendig, um geeignetes Trennmateri-  
al zu erhalten.

EP-B-0 157 365 beschreibt stationäre Phasen zur Enantiomeren- und Isomeren-  
trennung und für die Gelpermeationschromatographie auf der Basis von Polysaccharid-Carbam-  
at-Derivaten. Als Polysaccharide sind Cellulose, Amylose, Chitosan, Xylan, Dextran und Inulin geeignet. Hierbei kann das hergestellte Pulver mit einem Partikeldurchmesser von 1 µm bis 300 µm direkt oder nach physikalischer

oder chemischer Fixierung auf einem porösen Träger eingesetzt werden. Es ist also eine chemische Modifizierung notwendig, um geeignetes Trennmaterial zu erhalten.

In DE-C 26 55 292 und DE-C 25 55 361 werden poröse Gele aus Dextranderivaten als Trennungsmedien in elektrophoretischen Trennungsmaterialien eingesetzt. Um eine Unlöslichkeit zu erzielen, müssen vinylgruppenhaltige Dextranderivate durch radikalische Polymerisation vernetzt werden.

Es sind also bereits zahlreiche Polysaccharide bekannt, die in chromatographischen Trennverfahren eingesetzt werden. Diese müssen jedoch immer, um eine gute Trennleistung, Korngrößenverteilung, Lösungsmittelstabilität und -resistenz zu erzielen, chemisch und/oder physikalisch modifiziert werden. Dies ist immer mit einer Erhöhung der Kosten verbunden.

Unter chemischen und/oder physikalischen Modifizierungen sind insbesondere Derivatisierungen durch die Einführung spezieller Gruppen, kovalente Fixierungen auf einem Trägermaterial sowie nachträgliche chemische und/oder physikalische Vernetzungen zu verstehen.

Aufgabe der Erfindung ist daher eine Vereinfachung und Verbilligung des Chromatographieverfahrens durch Umgehung von chemischen und physikalischen Modifizierungen des eingesetzten Trennmaterials.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren zur chromatographischen Trennung von Stoffgemischen unter Einsatz von sphärischen Mikropartikeln aus chemisch und physikalisch unmodifizierten, wasserunlöslichen, linearen Polysacchariden (nachstehend erfindungsgemäßes Trennmaterial genannt) als Trennmaterial gelöst.

Unter sphärischen Mikropartikeln sind Mikropartikel, die annähernd Kugelform besitzen, zu verstehen. Bei Beschreibung einer Kugel durch von einem gemeinsamen Ursprung ausgehende, in den Raum gerichtete Achsen gleicher Länge, die

den Radius der Kugel in allen Raumrichtungen definieren, ist für die sphärischen Mikropartikel eine Abweichung der Achsenlängen von 1% bis 40% möglich. Bevorzugt werden sphärische Mikropartikel mit Abweichungen bis 25 %, besonders bevorzugt bis 15 % erhalten. Die Oberfläche der sphärischen Mikropartikel kann makroskopisch mit der einer Himbeere verglichen werden, wobei die Tiefe der „Eindellungen“ oder „Einschnitte“ maximal 20 % des mittleren Durchmessers der sphärischen Mikropartikel betragen soll. Die Figuren 1 bis 4 zeigen Rasterelektronenmikroskopaufnahmen (REM) (Camscan S-4) der verwendeten sphärischen Mikropartikel.

Durch die Umgehung von chemischen und physikalischen Modifizierungen der linearen Polysaccharide können zusätzlich kostenintensive Verfahrensschritte vermieden und dadurch die Wirtschaftlichkeit des Chromatographieverfahrens erhöht werden. Ein weiterer Vorteil ist die sehr gute Reproduzierbarkeit des Chromatographie-Prozesses.

Unter physikalischen Modifikationen sind nicht die üblichen Aufarbeitungsschritte wie Rühren, Zentrifugieren, Aufschlämmen usw. zu verstehen.

Lineare Polysaccharide gemäß der vorliegenden Erfindung können Polyglucane oder andere lineare Polysaccharide wie Pullulane, Pektine, Mannane oder Polyfructane sein. Besonders bevorzugt ist jedoch Poly-(1,4- $\alpha$ -D-glucan).

Das erfindungsgemäße Trennmateriale kann zur chromatographischen Trennung von Substanzgemischen, besonders bevorzugt Stereoisomeren, ganz besonders bevorzugt Enantiomeren eingesetzt werden. Daher ist besonders der Einsatz des erfindungsgemäßen Trennmateriale in der präparativen und analytischen Chromatographie wie Gaschromatographie, präparativer und analytischer Dünnschichtchromatographie und besonders High Performance Liquid Chromatography (HPLC), von Interesse. Weiterhin ist die Verwendung des erfindungsgemäßen Trennmateriale in der Gel-Permeations-Chromatographie (GPC)

bei der Auftrennung von Polymeren verschiedener Molekulargewichte von Interesse. Eine Anwendung, die ebenfalls in den Bereich der Erfindung fällt, ist die Abtrennung von Substanzen aus Lösungen, Emulsionen oder Suspensionen durch spezifische oder unspezifische Wechselwirkungen mit niedermolekularen oder polymeren Verbindungen. Aber auch ionische Verbindungen, insbesondere Metallkationen, sind von Interesse für die Anwendung. Spezielle Effekte sind insbesondere aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Polysacchariden bei der Abtrennung von Monosacchariden, Disacchariden und Oligosacchariden erzielbar.

Auch aus Gründen der Biokompatibilität des erfindungsgemäßen Trennmaterials ist ebenfalls ein Gegenstand der Erfindung die Behandlung von Wasser, insbesondere Abwasser, die Analyse von biologischem Material, insbesondere Blut und Seren, oder beispielsweise die Auftrennung bzw. Abtrennung von Erbgutmaterial (Nukleinsäuren) oder anderen biogenen Verbindungen (z.B. Oligonucleotide, Peptide, Proteine).

Unter Chromatographie versteht man im Sinne der Erfindung physikalische Trennverfahren, bei denen die Stofftrennung durch Verteilung und / oder Adsorption zwischen einer stationären und einer mobilen Phase erfolgt. Im Rahmen dieser Erfindung wird das erfindungsgemäße Trennmaterial, vorzugsweise Poly(1,4-alpha-D-Glucan), als stationäre Phase verwendet und mit einer flüssigen und/oder gasförmigen mobilen Phase kombiniert. Als besondere Ausführungsformen sind daher zu sehen: HPLC, GPC, GC, DC und weitere oder etwaige Spezifikationen chromatographischer Verfahren oder chromatographieähnlicher Verfahren. Prinzipiell ist jedes chromatographische Verfahren der Erfindung zugänglich.

Unter HPLC (High Performance (oder) High Pressure Liquid Chromatography) ist die Hochleistungs- (oder) Hochdruckflüssigkeitschromatographie zu verstehen. Man arbeitet bei der HPLC mit sehr feinem Material (3-10 µm), da die Trennleistung einer Säule mit abnehmender Korngröße der stationären Phase zunimmt. Die Feinteiligkeit der Trennmaterialien erfordert hohe Drücke (bis zu 400 bar).

Bei der Gel-Permeations-Chromatographie (GPC), auch Ausschlußchromatographie, die auch als HPLC betrieben werden kann, besteht die stationäre Phase aus Perlen mit einem heteroporösen gequollenen Netzwerk, dessen Porengrößenverteilung über mehrere Größenordnungen variiert, so daß die Fraktionierung nach Molekulargröße erfolgt, was die rasche Bestimmung der molekularen Größenverteilung von Polymeren gestattet.

Die Gaschromatographie (GC) dient zur Trennung von Stoffgemischen, die gasförmig vorliegen oder sich unzersetzt verdampfen lassen, wobei als mobile Phase ein Gas dient. Die gaschromatographische Analyse beginnt mit dem Aufbringen eines Gases, einer verdampfbaren Flüssigkeit oder eines verdampfbaren Feststoffes auf die thermostatisierte Trennsäule. Mit Hilfe des Trägergases (He, N<sub>2</sub> oder H<sub>2</sub>) werden die Substanzen durch die Säule transportiert, wo die chromatographische Trennung stattfindet.

Bei der Dünnschichtchromatographie (DC) handelt es sich um ein chromatographisches Verfahren mit einem mehrstufigen Verteilungsprozeß, wobei die stationäre Phase (das Trennmateriel wird hier Sorptionsmittel genannt) als dünne Schicht auf einem geeigneten Träger beispielsweise Glas, Polyester od. Aluminium befindet. An dieser Schicht erfolgt die Trennung durch Elution mit dem Laufmittel (mobile Phase).

Ein Gegenstand der Erfindung ist daher das erfindungsgemäße Trennmateriel als solches enthaltend sphärischen Mikropartikeln aus chemisch und physikalisch unmodifizierten, wasserunlöslichen, linearen Polysacchariden und ggf. weitere Hilf-, Zusatz und Trägerstoffe.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist der Einsatz des erfindungsgemäßen Trennmateriels und ggf. weitere Hilf-, Zusatzstoffe zur Abtrennung oder Rückhaltung von Stoffen im Sinne eines Filtermittels oder Adsorbens (Vgl. Beispiel 12).

Lineare Polysaccharide sind Polysaccharide, die aus Monosacchariden, Disacchariden oder anderen monomeren Bausteinen derart aufgebaut sind, daß die Monosaccharide, Disaccharide oder anderen monomeren Bausteinen stets in der gleichen Art miteinander verknüpft sind. Jede derart definierte Grundeinheit oder Baustein hat genau zwei Verknüpfungen, jeweils eine zu einem anderen Monomer. Davon sind die beiden Grundeinheiten ausgenommen, die den Anfang und das Ende des Polysaccharids bilden. Diese Grundeinheiten haben nur eine Verknüpfung zu einem weiteren Monomer. Bei drei Verknüpfungen (kovalente Bindungen) spricht man von einer Verzweigung. Verzweigungen treten nicht oder nur in untergeordnetem Maß auf, so daß sie bei sehr kleinen Verzweigungsanteilen den herkömmlichen analytischen Methoden nicht zugänglich sind.

Beispiele für bevorzugte wasserunlösliche lineare Polysaccharide sind lineare Poly-D-glucane, wobei die Art der Verknüpfung unwesentlich ist, solange Linearität im Sinne der Erfindung vorliegt. Beispiele sind Poly(1,4-alpha-D-Glucan) und Poly(1,3-beta-D-Glucan), wobei Poly(1,4-alpha-D-Glucan) besonders bevorzugt ist.

Besitzt die Grundeinheit drei oder mehr Verknüpfungen, wird von Verzweigung gesprochen. Dabei ergibt sich aus der Anzahl der Hydroxylgruppen pro 100 Grundeinheit, die nicht am Aufbau des linearen Polymerrückgrats beteiligt sind und die Verzweigungen ausbilden, der sogenannte Verzweigungsgrad.

Erfindungsgemäß weisen die linearen wasserunlöslichen Polysaccharide einen Verzweigungsgrad von weniger als 8 % auf, d.h. sie haben weniger als 8 Verzweigungen auf 100 Grundeinheiten. Vorzugsweise ist der Verzweigungsgrad kleiner 4 % und insbesondere maximal 1,5 %.

Ist das wasserunlösliche lineare Polysaccharid ein Polyglucan, z.B. Poly-(1,4-alpha-D-Glucan), ist der Verzweigungsgrad in 6-Position kleiner 4 %, vorzugsweise maximal 2 % und insbesondere maximal 0,5 % und der Verzweigungsgrad in den

anderen nicht an der linearen Verknüpfung beteiligten Positionen, z.B. der 2- bzw. 3-Position im Fall des bevorzugten Poly-(1,4-alpha-D-Glucans), ist vorzugsweise jeweils maximal 2 % und insbesondere maximal 1 %.

Besonders bevorzugt sind Polysaccharide, insbesondere Poly-alpha-D-Glucane, die keine Verzweigungen aufweisen, bzw. deren Verzweigungsgrad so minimal ist, daß er mit herkömmlichen Methoden nicht mehr nachweisbar ist.

Erfindungsgemäß beziehen die Präfixe "alpha", "beta" oder "D" allein auf die Verknüpfungen, die das Polymerrückgrat ausbilden und nicht auf die Verzweigungen.

Unter naturidentischen Polysacchariden sind dabei Polymere zu verstehen, die entweder so in der Natur nicht auftreten oder aber nur in einer Mischung mit anderen Verbindungen, die auch andere Polymere sein können. Die Herstellung solcher naturidentischen Polymere ist durch Verfahren möglich, die unter den im breitesten Sinn zu definierenden Begriff der bio- und gentechnologischen Verfahren fallen. Darunter sind einerseits biotechnische Verfahren oder Prozesse zu verstehen, wie sei weiter unten definiert werden, aber auch solche, die durch die Verwendung und Modifikation von zum Beispiel Bakterien, Pilzen oder Algen zu entsprechenden Verbindungen führen. Andererseits fallen unter den Begriff aber auch zum Beispiel Polysaccharide, die dadurch zu gewinnen sind, daß bio- oder gentechnische Verfahren auf höhere Pflanzen angewendet werden, so daß eine Separation aus der Pflanze erfolgen kann. Zu solchen Pflanzen gehören insbesondere die Kartoffel, Mais, Getreidearten, Maniok, Reis und Erbsen. Aber auch andere Pflanzen, die Polysaccharide produzieren sind unter dem erfindungsgemäßen Aspekt in diese Kategorie einzuordnen.

Im Rahmen der Erfindung werden bevorzugt lineare, wasserunlösliche Polysaccharide verwendet, welche in einem biotechnischen, insbesondere einem biokataly-

tischen auch biotransformatorischen oder einem fermentativen Prozeß hergestellt werden. Unter biotechnische Prozesse fallen sämtliche biokatalytischen, (= biotransformatorischen Verfahren, also Verfahren, die nur mit Enzymen oder in der Kombination mit Organismen, die intra- oder extrazellulär Proteine bilden, die diese Aufgabe übernehmen, durchgeführt werden können) oder fermentative Verfahren, die mit in der Natur vorkommenden oder rekombinanten Organismen durchgeführt werden können.

Lineare Polysaccharide hergestellt durch Biokatalyse (auch: Biotransformation) im Rahmen dieser Erfindung bedeutet, daß das lineare Polysaccharid durch katalytische Reaktion von monomeren Grundbausteinen wie oligomeren Sacchariden, z.B. von Mono- und/oder Disacchariden, hergestellt wird, indem ein sogenannter Biokatalysator, üblicherweise ein Enzym, unter geeigneten Bedingungen zum Einsatz für die Umsetzung genutzt wird.

Lineare Polysaccharide aus Fermentationen sind im Sprachgebrauch der Erfindung lineare Polysaccharide, die durch fermentative Prozesse unter der Verwendung in der Natur vorkommender Organismen, wie zum Beispiel Pilze, Algen oder Bakterien oder unter der Verwendung von in der Natur nicht vorkommenden Organismen, aber unter Zuhilfenahme von gentechnischen Methoden allgemeiner Definition modifizierten natürlichen Organismen, wie zum Beispiel Pilze, Algen oder Bakterien gewonnen werden können.

Darüber hinaus können lineare Polysaccharide zum Erzielen der in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Effekte auch dadurch erhalten werden, daß nicht-lineare Polysaccharide, die Verzweigungen enthalten, derart mit einem oder mehreren Enzymen behandelt werden, daß die Verzweigungen vom Rückgrat des Polysaccharids abgespalten werden, so daß nach ihrer Abtrennung lineare Polysaccharide vorliegen. Bei diesen Enzymen handelt es sich beispielsweise um Amylasen, iso-Amylasen, Pullulanasen oder auch Gluconohydrolasen.

Unter dem Begriff "wasserunlösliche Polysaccharide" werden für die vorliegende Erfindung Verbindungen verstanden, die nach der Definition des Deutschen Arzneimittelbuches (DAB = Deutsches Arzneimittelbuch, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Govi-Verlag, Frankfurt, Auflage, 1987) entsprechend den Klassen 4 bis 7 unter die Kategorien "wenig lösliche", "schwer lösliche", "sehr schwer lösliche" bzw. "praktisch unlösliche" Verbindungen fallen.

Im Fall der erfindungsgemäß verwendeten Polysaccharide bedeutet dies, daß mindestens 98 % der eingesetzten Menge, insbesondere mindestens 99,5 %, unter Normalbedingungen ( $T = 25^{\circ}\text{C} \pm 20\%$ ,  $p = 101325 \text{ Pascal} \pm 20\%$ ) in Wasser unlöslich ist (entsprechend den Klassen 4 bzw. 5).

Für die vorliegende Erfindung sind schwer lösliche bis praktisch unlösliche Verbindungen, insbesondere sehr schwer lösliche bis praktisch unlösliche Verbindungen, bevorzugt.

"Sehr schwer löslich" entsprechend Klasse 6 kann durch folgende Versuchsbeschreibung veranschaulicht werden:

Ein Gramm des zu untersuchenden Polyglucans/saccharids werden in 1 l entionisierten Wasser auf  $130^{\circ}\text{C}$  unter einem Druck von 1 bar erhitzt. Die entstehende Lösung bleibt nur kurzzeitig über wenige Minuten stabil. Beim Erkalten unter Normalbedingungen fällt die Substanz wieder aus. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur und Abtrennung mittels Zentrifugation können unter Berücksichtigung der experimentellen Verluste mindestens 66 % der eingesetzten Menge zurückgewonnen werden.

Herstellung einheitlicher sphärischer Mikropartikel

Das bevorzugt zum Einsatz gelangende Poly-(1,4- $\alpha$ -D-glucan) kann auf verschiedene Weisen hergestellt werden. Eine sehr vorteilhafte Methode wird in der WO 95/31553 beschrieben. Auf die Offenbarung der Schrift wird sich hier ausdrücklich

bezogen. Darin wird das Poly-(1,4- $\alpha$ -D-glucan) mittels eines biokatalytischen (biotransformatorischen) Prozesses mit Hilfe von Amylosucrase hergestellt. Weiterhin kann das Poly-(1,4- $\alpha$ -D-glucan) unter Verwendung von Polysaccharidsynthasen, Stärkesynthasen, Glycoltransferasen, 1,4- $\alpha$ -D-Glucantransferasen, Glycogensynthasen oder Phosphorylasen mittels eines biokatalytischen Prozesses hergestellt werden.

Die Patentanmeldung DE-A-197 37 481 beschreibt die Herstellung von sphärischen Mikropartikeln aus linearen wasserunlöslichen Polysacchariden, sowie deren Molekulargewichte und Durchmesser. Auf die oben genannte Anmeldung wird hier Bezug genommen.

Die Herstellung der sphärischen Mikropartikel erfolgt durch Lösen des wasserunlöslichen, linearen Polysaccharids, insbesondere des Poly-(1,4- $\alpha$ -D-glucans), in einem Lösungsmittel, besonders bevorzugt in DMSO, Einbringen der Lösung in ein Fällungsmittel, bevorzugt Wasser, Kühlen des dabei entstehenden Gemisches auf vorzugsweise 10°C bis -10°C und Abtrennen der gebildeten Mikropartikel.

Durch Mitverwendung geeigneter Zusatzstoffe läßt sich auf die Eigenschaften der Partikel wie Größe, Struktur der Oberfläche, Porosität usw. sowie auf die Prozeßführung Einfluß nehmen. Geeignete Zusatzstoffe sind beispielsweise oberflächenaktive Stoffe wie Natriumdodecylsulfat oder N-Methylglucanoamid, Zucker, z.B. Fructose, Saccharose, Glucose.

#### Eigenschaften der sphärischen Mikropartikel

Die Molekulargewichte  $M_w$  der erfindungsgemäß verwendeten linearen Polysaccharide können in einem weiten Bereich von  $10^3$  g/mol bis  $10^7$  g/mol variieren. Für das vorzugsweise verwendete lineare Polysaccharid Poly-(1,4- $\alpha$ -D-glucan) werden bevorzugt Molekulargewichte  $M_w$  im Bereich von  $10^4$  g/mol bis  $10^5$  g/mol, insbesondere  $2 \times 10^4$  g/mol bis  $5 \times 10^4$  g/mol verwendet. Das Molekulargewicht  $M_w$  beschreibt das Gewichtsmittel des Molekulargewichts und wird mittels Gel-Per-

meations-Chromatographie im Vergleich zu einer Eichung mit Pullulanstandards ermittelt.

Die Partikel können mittlere Durchmesser (Zahlenmittelwert) aufweisen wie 1 nm bis 100  $\mu\text{m}$ , bevorzugt 100 nm bis 10  $\mu\text{m}$ , besonders bevorzugt 1  $\mu\text{m}$  bis 5  $\mu\text{m}$ . Die Verteilung der Durchmesser zeichnet sich durch eine hohe Einheitlichkeit aus.

Die Mikropartikel aus Poly-(1,4- $\alpha$ -D-glucan) zeichnen sich durch eine spezifische Oberfläche von 1  $\text{m}^2/\text{g}$  bis 100  $\text{m}^2/\text{g}$ , besonders bevorzugt 3  $\text{m}^2/\text{g}$  bis 10  $\text{m}^2/\text{g}$  aus.

Versuche zur Stabilität der Mikropartikel in verschiedenen Lösungsmitteln zeigen, daß eine große Vielfalt an Lösungsmitteln für den Einsatz in dem erfindungsgemäßen Chromatographieverfahren geeignet sind. Als Lösungsmittel, in Funktion des Elutionsmittels, werden z.B. n-Hexan, Dichlormethan, Tetrahydrofuran, 1,4-Dioxan, Ethanol, Aceton, Acetonitril, Methanol, n-Heptan und Wasser verwendet.

#### Chromatographieverfahren

Im Chromatographieverfahren werden erfindungsgemäß Mikropartikel aus linearen Polysacchariden, besonders bevorzugt Poly-(1,4- $\alpha$ -D-glucan), insbesondere in einem Lösungsmittel, z.B. n-Heptan, aufgeschlämmt, mittels eines Ultraturrax aufgewirbelt und im Ultraschallbad entgast. Die Suspension wird in eine Säule gefüllt und durch ständiges Klopfen an der Säule, ständiges Schütteln in Kombination mit kurzzeitiger Behandlung im Ultraschallbad gleichmäßig und dicht gepackt, so daß totvolumenarme Packungen entstehen. Die Trennungen werden in einer dem Stand der Technik entsprechenden Chromatographie-Anlage für die HPLC durchgeführt. Dabei beträgt die Probenkonzentration 2,0 bis 0,025 mg/l Lösungsmittel, besonders bevorzugt 0,25 bis 0,05 mg/l Lösungsmittel. Die Elutionsgeschwindigkeit beträgt 2,0 bis 0,25 ml/min, bevorzugt 1,0 bis 0,4 ml/min, besonders bevorzugt 0,5 ml/min. Diese Angaben können in Abhängigkeit von dem verwendeten Lösungsmittel variieren. Die verwendeten Drucke sind stark von der Polarität des Lösungsmittels ab-

hängig. Sie liegen i.a. in einem Bereich zwischen 30 bar und 200 bar. Es wurden beispielsweise die folgenden Drucke gemessen: 138 bis 159 bar für Acetonitril, etwa 100 bar für Essigester, etwa 62 bar für t-Butyl-methyl-ether und 54 bis 70 bar für n-Heptan. Es kann ein innerer Standard, z.B. 1,3,5-Tri-tert-butylbenzol, verwendet werden.

**Beschreibung der Figuren:**

Fig. 1: Rasterelektronenmikroskopaufnahme (siehe Beispiel 4) der verwendeten sphärischen Mikropartikel in 5000x Vergrößerung.

Fig. 2: Rasterelektronenmikroskopaufnahme (siehe Beispiel 4) der verwendeten sphärischen Mikropartikel in 10000x Vergrößerung.

Fig. 3: Rasterelektronenmikroskopaufnahme (siehe Beispiel 4) der verwendeten sphärischen Mikropartikel in 15000x Vergrößerung.

Fig. 4: Rasterelektronenmikroskopaufnahme (siehe Beispiel 4) der verwendeten sphärischen Mikropartikel in 20000x Vergrößerung.

Fig. 5: Agarosegel (Detektion mit Ethidiumbromid 0,5 pg/ml bei 256 nm) gemäß Beispiel 12, beachte Legende.

Fig. 6: Agarosegel (Detektion mit Ethidiumbromid 0,5 pg/ml bei 256 nm) gemäß Beispiel 12, beachte Legende.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher, ohne die Erfindung auf diese Beispiele einzuschränken.

**Beispiele:****Beispiel 1**

In-vitro-Produktion eines linearen wasserunlöslichen Polysaccharids in einem biokatalytischen Prozeß am Beispiel des Poly-(1,4- $\alpha$ -D-glucans) mit Amylosucrase

In ein sterilisiertes (Dampfsterilisation) 15 l Gefäß werden 10 l einer 20 %igen Saccharose Lösung gegeben. Der Enzymextrakt, Amylosucrase enthaltend, wird in einer Portion zugegeben. Die Enzymaktivität beträgt in diesem Experiment 20 units (1 unit = 1  $\mu$ mol Saccharose  $\times$  min<sup>-1</sup>  $\times$  mg Enzym). Die Apparatur wird mit einem ebenfalls sterilisierten KPG-Rührer versehen. Das Gefäß wird verschlossen, bei 37°C aufbewahrt und gerührt. Bereits nach einer Zeit von wenigen Stunden bildet sich ein weißer Niederschlag. Die Reaktion wird nach einer Zeitdauer von 96 Stunden beendet. Der Niederschlag wird abfiltriert und zur Abtrennung niedermolekularer Zucker mehrfach mit Wasser gewaschen. Der im Filter verbleibende Rückstand wird bei 40°C im Trockenschrank unter Anlegung eines Vakuums mit Hilfe einer Membranpumpe (Firma Vacuubrand GmbH & Co., CVC 2) getrocknet. Die Masse beträgt 651 g (Ausbeute 65%).

**Beispiel 2**

Bestimmung des Molekulargewichts des mit Amylosucrase synthetisierten wasserunlöslichen Poly-(1,4- $\alpha$ -D-glucans) aus Beispiel 1

Es werden 2 mg des Poly-(1,4- $\alpha$ -D-glucans) aus Beispiel 1 bei Raumtemperatur in Dimethylsulfoxid (DMSO, p.a. von Riedel-de-Haen) gelöst und filtriert (2  $\mu$ m Filter). Ein Teil der Lösung wird in eine Gel-Permeations-Chromatographie Säule injiziert. Als Elutionsmittel wird DMSO verwendet. Die Signalintensität wird mittels eines RI-Detektors gemessen und gegen Pullulanstandards (Firma Polymer Standard Systems) ausgewertet. Die Flußrate beträgt 1.0 ml pro Minute. Die Messung ergibt ein Zahlenmittel des Molekulargewichts ( $M_n$ ) von 7.000 g/mol und ein Gewichtsmittel des Molekulargewichts ( $M_w$ ) von 34.000 g/mol.

**Beispiel 3****Herstellung von Mikropartikeln aus Poly-(1,4- $\alpha$ -D-glucan)**

- a) 400 g Poly-(1,4- $\alpha$ -D-glucan) werden in 2 l Dimethylsulfoxid (DMSO, p.a. von Riedel-de-Haen) bei 60°C innerhalb von 1,5 h gelöst. Dann wird eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird in 20 l bidestilliertem Wasser unter Rühren durch einen Tropftrichter über einen Zeitraum von 2 h hinzugegeben. Der Ansatz wird für 44 h bei 4°C gelagert. Es bildet sich eine feine Suspension aus. Die Partikel werden abgetrennt, indem zunächst der Überstand abdekantiert wird. Der Bodensatz wird aufgeschlämmt und in kleinen Portionen zentrifugiert (Ultrazentrifuge RC5C: je 5 Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minute). Der feste Rückstand wird insgesamt drei Mal mit bidestilliertem Wasser aufgeschlämmt und erneut zentrifugiert. Die Feststoffe werden gesammelt und die Suspension von ca. 1000 ml gefriergetrocknet (Christ Delta 1-24 KD). Es werden 283 g weißer Feststoff isoliert (Ausbeute 71 %).
- b) Die gesammelten Überstände werden bei einer Temperatur von 18°C über Nacht verwahrt. Die Aufarbeitung erfolgt wie beschrieben. Es werden weitere 55 g des weißen Feststoffs isoliert (Ausbeute 14 %).

Die Gesamtausbeute dieses Prozesses beträgt somit 85 %.

**Beispiel 4****Untersuchungen der Mikropartikel aus dem Beispiel 3 mittels Elektronenmikroskopie**

Zur Charakterisierung der Partikel werden Rasterelektronenmikroskopaufnahmen (REM) (Camscan S-4) durchgeführt. Die Figuren 1 bis 4 zeigen Aufnahmen der Partikel, die verdeutlichen, daß es sich um sphärische, sehr einheitliche Partikel hinsichtlich der Form, Größe und Oberflächenrauheit handelt.

**Beispiel 5****Untersuchungen der Größenverteilungen der Partikel aus Beispiel 3**

Zur Charakterisierung der Größenverteilung der Partikel aus den Beispielen 3 wurden Untersuchungen mit einem Mastersizer durchgeführt (Fa. Malvern Instruments). Die Untersuchung erfolgte im Fraunhofer Modus (Auswertung: multimodal, Anzahl) unter Annahme einer Dichte von  $1,080 \text{ g/cm}^3$  und einer Volumenkonzentration im Bereich von 0,012 % bis 0,014 %.

Tabelle 1:

Charakterisierung der Partikeldurchmesser aus den Beispielen 3

Beispiele	Durchmesser			Partikelverteilung		
1						
No.	$dn^{*2}$ ( $\mu m$ )	$Dw^{*2}$ ( $\mu m$ )	$dw / dn^{*3}$	$d (10 \%)^{*4}$ ( $\mu m$ )	$D (50 \%)^{*5}$ ( $\mu m$ )	$d (90 \%)^{*6}$ ( $\mu m$ )
3a	1,664	4,184	2,541	0,873	1,504	2,624
3b	0,945	2,345	2,481	0,587	0,871	1,399

\*1  $dn$ : Zahlenmittelwert des Durchmessers

\*2  $dw$ : Gewichtsmittelwert des Durchmessers

\*3  $dw / dn$ : Ispersität der Partikeldurchmesser

\*4  $d (10 \%)$ : 10 % aller Partikel haben einen kleineren Durchmesser als der angegebene Wert

\*5  $d (50 \%)$ : 50 % aller Partikel haben einen kleineren Durchmesser als der angegebene Wert

\*6  $d (90 \%)$ : 90 % aller Partikel haben einen kleineren Durchmesser als der angegebene Wert

#### Beispiel 6

Bestimmung der spezifischen Oberfläche von Poly-(1,4- $\alpha$ -D-glucan)

(Vergleichsbeispiel) und Mikropartikeln aus Poly-(1,4- $\alpha$ -D-glucan) und

Kartoffelstärke (Vergleichsbeispiel)

Die Messungen der spezifischen Oberfläche werden mit einem Sorptomatic 1990 (Fa. Fisons Instruments) hergestellt. Zur Auswertung wird die 'default method sorptomatic'-Methode angewendet. Für die Untersuchung werden die Proben bei 80°C im Vakuum (Membranpumpe der Firma Vacuubrand GmbH & Co., CVC 2) über Nacht getrocknet. Die Kartoffelstärke und das direkt aus der Biotransformation gewonnene Poly-(1,4- $\alpha$ -D-glucan) werden zuvor gemahlen, so daß die Masse der

Partikel im Bereich kleiner 200 Mikrometer liegt. Hierzu wird eine handelsübliche Mühle verwendet (Fa. Waring®).

Tabelle 2:

Charakterisierung der spezifischen Oberfläche der Mikropartikel aus Poly-(1,4- $\alpha$ -D-glucan) (siehe Beispiel 3)

Beispiel No.	Substanz	Spezifische Oberfläche m <sup>2</sup> /g
1	Poly-(1,4- $\alpha$ -D-glucan)	2,243
3	Mikropartikel aus Poly-(1,4- $\alpha$ -D-glucan)	4,527
-	Kartoffelstärke (Toffena, Fa. Südstärke)	1,280

#### Beispiel 7

Versuche zur Stabilität der Mikropartikel in verschiedenen Lösungsmitteln zur Bestimmung der verwendbaren Lösungsmittel

Zur Austestung der Eignung verschiedener Lösungsmittel in der chromatographischen Anwendung mit Mikropartikeln aus Poly-(1,4- $\alpha$ -D-glucan) wird wie folgt verfahren: 100 mg der Partikel aus Beispiel 3 werden in einem Rollrandgläschen mit jeweils 3 ml des Lösungsmittels überschichtet. Die Beobachtungszeit beträgt 24 Stunden. In stundenweisen Abständen werden die Partikel nach Veränderungen untersucht. Zu diesem Zweck wird das Reaktionsgefäß geschwenkt.

Die Ergebnisse zeigen, daß eine hohe Vielfalt an Lösungsmitteln für die hier beschriebene chromatographische Verwendung zum Einsatz kommen kann. Auszuschließen sind nur Toluol, Essigester und Dimethylsulfoxid. Im nichtaufgeführten Einzelfall muß das Lösungsmittel zunächst auf seine Verwendbarkeit hin überprüft werden. Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle

3 festgehalten. Dabei wurden die Dielektrizitätskonstanten, sowie das Dipolmoment und/oder der Polaritätsindex nach Snyder angegeben, um einen Anhaltspunkt für die Polarität des Lösungsmittels zu geben.

Tabelle 3:

Ergebnisse der Untersuchungen zur Stabilität von Mikropartikeln aus Poly-(1,4- $\alpha$ -D-glucan) (siehe Beispiel 3) in verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	Dielektrizitäts- Konstante ( $\epsilon$ ) <sup>*1</sup>	Dipol- moment D <sup>*2</sup>	Polaritäts- Index <sup>*3</sup>	Beobachtung (nach 24 h)
n-Hexan	1,8865	—	0,0	keine Veränderung
n-Heptan	1,9209	—	0,0	keine Veränderung
Toluol	2,379	0,375	2,3	Transparent, leicht gequollenes Material, trüber Überstand
Essigester	6,0814	1,78	—	Partikel verkleben, trüber Überstand
Dichlormethan	8,93	1,60	3,4	keine Veränderung
Tetrahydrofuran	7,2	1,75	4,2	keine Veränderung
1,4-Dioxan	2,2189	—	4,8	keine Veränderung
Ethanol	25,3	1,69	5,2	keine Veränderung
Aceton	21,01	2,88	5,4	keine Veränderung
Acetonitril	36,64	3,924	6,2	keine Veränderung
Methanol	33,0	1,7	6,6	keine Veränderung
Dimethylformamid	38,25	3,82	—	keine Veränderung
Dimethylsulfoxid	47,24	3,96	—	gelöst
Wasser	80,100	1,854	9,0	keine Veränderung

\*1 Dielektrizitätskonstante nach „Handbook of Chemistry and Physics, 77<sup>th</sup> Edition“

\*2 Dipolmoment nach „Handbook of Chemistry and Physics, 77<sup>th</sup> Edition“

\*3 Polaritätsindex nach Snyder aus: Merck, ChromBook

**Beispiel 8****Füllen einer Chromatographiesäule mit Mikropartikeln aus Beispiel 3a**

5 g der Partikel aus Beispiel 3a werden in ca. 60 ml Heptan aufgeschlämmt. Mittels eines Ultraturrax (Fa. Ika) wird die Suspension kurz aufgewirbelt und anschließend in einem Ultraschallbad (Sonorex Super RK510H) entgast. Die Suspension wird dann unter Maximalfluß in eine Säule mit den Maßen 125 mm Länge und 4 mm Durchmesser (Hibar® Fertigsäule der Firma Merck AG) gefüllt. Ständiges Klopfen an der Säule, bzw. ständiges Schütteln der Säule in Kombination mit kurzzeitiger, etwa einminütiger Behandlung im Ultraschallbad gewährleistet eine dichte und gleichmäßige Packung des Trennmaterials, so daß totvolumenarme Packungen entstehen.

**Beispiel 9****Trennung von Indol und 2-Methylindol in Heptan**

Die Trennungen werden in einer Chromatographie-Anlage Lichograph® der Firma Merck durchgeführt. Die einzelnen Bauteile sind: eine Gradientenpumpe L 6200 A, ein UV-Detektor L-400 (Messung bei 254 nm), ein Chromato-Integrator D-2500 und eine Trennsäule Hibar® Fertigsäule RT-125-4. Die Probenkonzentration beträgt idealerweise 0,05 bis 0,1 mg/ml Lösungsmittel. Als innerer Standard kann 1,3,5-Tert.-butylbenzol (Fa. Fluka) verwendet werden.

Die Chromatographiesäule ist mit n-Heptan (Aldrich zur HPLC) vorbereitet. Die Anlage wird mit n-Heptan gefahren. Die Elutionsgeschwindigkeit beträgt 0,5 ml/min. Der Druck beträgt 54 bar. Die zu trennenden Substanzen sind: Indol und 2-Methylindol.

Tabelle 4

Ergebnisse der Trennung von Indol und 2-Methylindol in Heptan

Substanz	Reaktionszeit (min)
1,3,5-Tri-tert.-butylbenzol (Standard)	1,86
Indol	9,12
Indol / 2-Methylindol	8,98 / 7,37
2-Methylindol	7,20

## Beispiel 10

Trennung von Indol und 2-Naphthol in Heptan

Der Versuch wird wie in Beispiel 10 beschrieben durchgeführt.

Tabelle 5:

Ergebnisse der Trennung von 2-Naphthol und Indol in Heptan

Substanz	Retentionszeit (min)
2-Naphthol	2,24
2-Naphthol / Indol	1,92 / 9,16
Indol	9,12

## Beispiel 11

Trennung eines Enantiomerengemisches: racemisches 1-(2-Naphthyl)-ethanol

Der Versuch wird analog zu Beispiel 10 durchgeführt. In diesem Beispiel liegt der Druck bei ca. 70 bar. Die Konzentration der Proben beträgt 0,25 mg/ml Lösungsmittel.

Tabelle 6:

Ergebnisse der Trennung von racemischem 1-(2-Naphthyl)-ethanol in Heptan

Substanz	Retentionszeit (min)
1,3,5-Tri-tert.-butylbenzol	1,89
(Standard)	
S-(-)-1-(2-Naphthyl)-ethanol	32,03
1,3,5-Tri-tert.-butylbenzol	1,87
(Standard)	
R-(+)-1-(2-Naphthyl)-ethanol	36,30

#### Beispiel 12

Abtrennung oder Rückhaltung von Stoffen, Verwendung des erfindungsgemäßen Trennmateri als Filtermittel

Einwegzentrifugenfilter (Firma Schleicher & Schüll, z.B. Centrix, Katalognummer 467012 (April 1996): „Filter 1“ in Fig.5 und 6) werden unter Einsatz von 580 mg der hergestellten Mikropartikel gemäß Beispiel 3 als Filtermaterial oder Adsorbens mit 3 ml einer Puffer 1 (siehe unten) Lösung equilibriert. (ggf. Zentrifuge (2000 U/min)). Anschließend werden 2ml einer wässrigen DNA-Plasmidlösung (verwendetes Plasmid: pBluescript II SK) mit der Konzentration 50 µg/ml auf den Filter gegeben (ggf. Zentrifuge (5min bei 2000 U/min)). Es erfolgt ein Referenzlauf mit („Filter 2“ in Fig. 5 und 6) Qiagen® Midipräp (Hilden, Deutschland) und ein weiterer Referenzlauf mit Qiagen® Midipräp - Kartuschen ohne Qiagen® Filtermittel, welche mit dem Trennmateri bestückt wurden.

Jeweils 5 µl Eluat, wird mit etwa 1/10 der Konzentration mit Anfärbereagenz (Marker) versehen und auf eine Agarosegelplatte (60% Saccharose, 20 mM EDTA, 0,025 % Bromphenolblau) aufgetragen mit anschließender Gelelektrophorese (Firma Biorad, Power Supply, Modell 100/200). Als Referenz zur Abschätzung und Einordnung detektierter Plasmide wird ein Marker (MG 5.000) in Spur 1 und die verwendete DNA-Plasmidlösung als Referenz aufgetragen. Fig. 5 zeigt, daß am

erfindungsgemäßen Trennmateriel (hier Filtermittel) die Proben - DNA zurückgehalten wurde.

Anschließend werden 5ml eines zweiten Puffers (Puffer 2) auf die Säule (Filter) zum Eluieren gegeben und schnell durch Zentrifugation aufgearbeitet (5min bei 2000 U/min).

Die Eluate (Referenzen wie vorgenannt) werden auf eine Agarosegelplatte (60% Saccharose, 20 mM EDTA, 0,025 % Bromphenolblau) aufgetragen und anschließend eine Gelelektrophorese (Firma Biorad, Power Supply, Modell 100/200) durchgeführt (siehe Fig. 6). Als Vergleich wurde ein Marker (MG 5.000) (Spur 1) und die DNA-Plasmidlösung (Spur 7) aufgetragen.

Fig. 6 zeigt, daß sich bei der Verwendung des erfindungsgemäßen Trennmateriels die eingesetzte Plasmid DNA wieder von der Säule eluiert wird. Der Vergleich mit kommerziell erhältlichen Filtermitteln zeigt die Güte des Filterprozesses, der mindestens die gleiche Qualität aufweist.

#### Pufferbeschreibung:

Puffer 1:	750 mM NaCl 50 mM MOPS (3-[N-morpholino]propanesulfonic acid, pK <sub>a</sub> 7.2) 15% Isopropanol 0,15% Triton® X-100
Puffer 2:	1,25 M NaCl 50 mM Tris, Tris*Clm, Ph 8,5 15% Isopropanol

**Fig 5:**

**Von links nach rechts:**

- Spur 1:       Marker (Boehringer Mannheim DNA Molecular Weight Marker X)**
- Spur 2:       Filter 2 ohne Trennmaterial (Blindreferenz)**
- Spur 3:       Filter 2 gefüllt mit erfindungsgemäßen Trennmaterial**
- Spur 4:       Filter 1: Kartusche Qiagen® mit erfindungsgemäßen Trennmaterial**
- Spur 5:       Filter 1: Qiagen® Midipräp (Hilden, Deutschland) Referenz**
- Spur 6:       Filter 2 mit Trennmaterial**
- Spur 7:       reine DNA-Plasmidlösung (handelsübliches Plasmid pBluescript II SK)**

**Fig. 6**

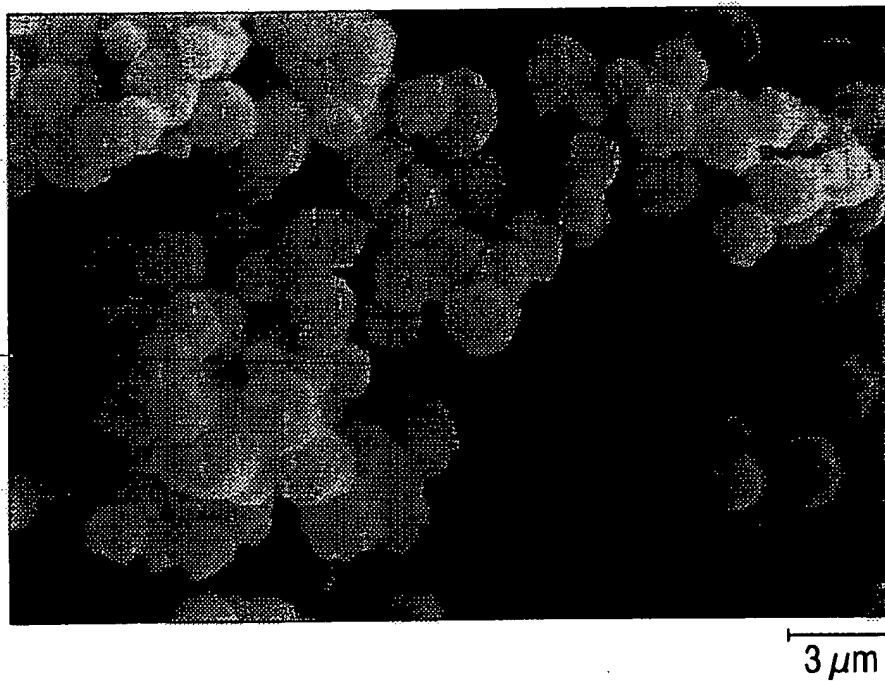
**Von links nach rechts:**

- Spur 1:       Marker (Boehringer Mannheim DNA Molecular Weight Marker X)**
- Spur 2:       Filter 2 ohne Trennmaterial (Blindreferenz)**
- Spur 3:       Filter 2 gefüllt mit erfindungsgemäßen Trennmaterial**
- Spur 4:       Filter 1: Kartusche Qiagen® mit erfindungsgemäßen Trennmaterial**
- Spur 5:       Filter 1: Qiagen® Midipräp (Hilden, Deutschland) Referenz**
- Spur 6:       Filter 2 mit Trennmaterial**
- Spur 7:       reine DNA-Plasmidlösung (handelsübliches Plasmid pBluescript II SK)**

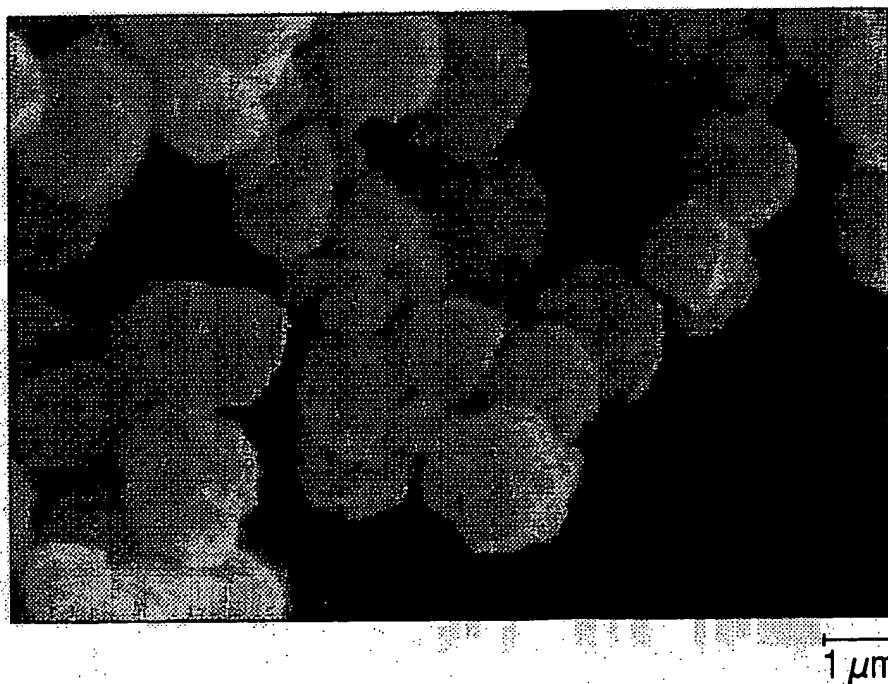
**Patentansprüche**

1. Verfahren zur chromatographischen Trennung von Stoffgemischen unter Einsatz von sphärischen Mikropartikeln aus chemisch und physikalisch unmodifizierten, wasserunlöslichen, linearen Polysacchariden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennungen säulenchromatographisch durchgeführt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennungen mit Hilfe von HPLC (Hochleistungs- (oder) Hochdruckflüssigkeitschromatographie) durchgeführt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennungen dünnschichtchromatographisch durchgeführt werden.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennung mit Hilfe der Gel-Permeations-Chromatographie durchgeführt werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Stoffgemische Stereoisomere sind.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Stoffgemische Enantiomere sind.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikropartikel einen Durchmesser von 10 nm bis 100 µm aufweisen.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikropartikel einen Durchmesser von 1 µm bis 5 µm aufweisen.

***Fig. 1***

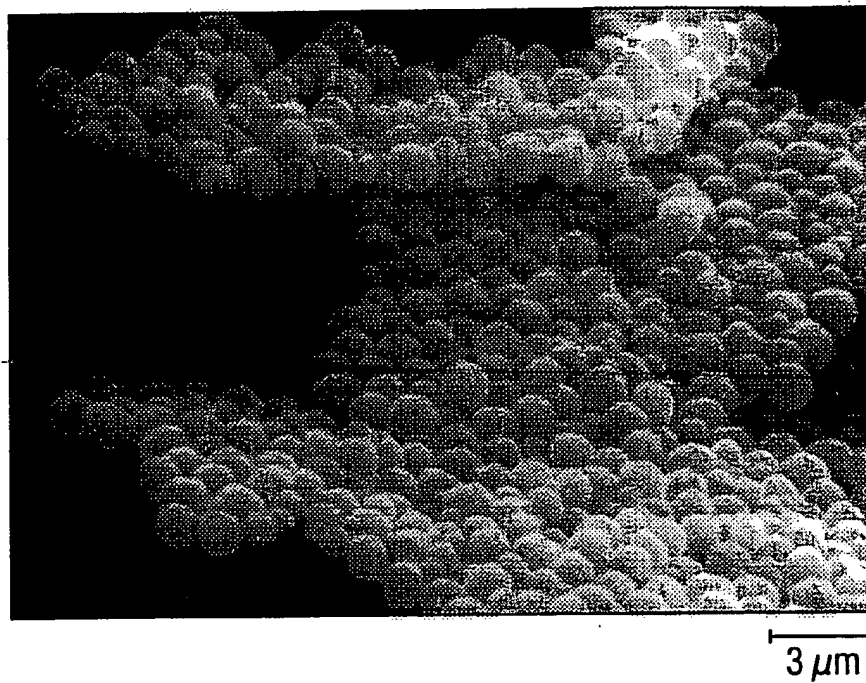


***Fig. 2***

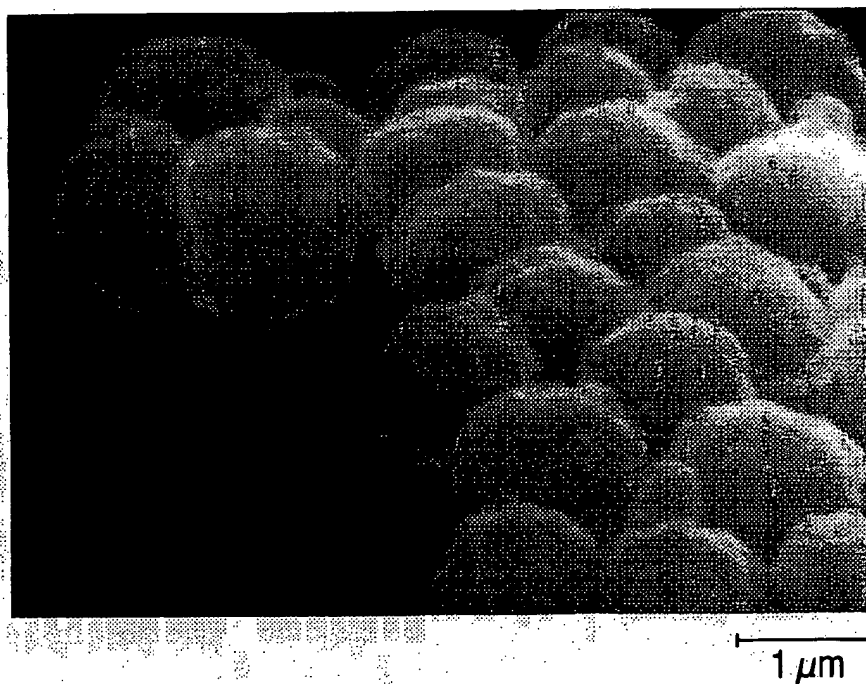


10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Polysaccharide Poly-(1,4- $\alpha$ -D-glucane) eingesetzt werden.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß Polysaccharide eingesetzt werden, die durch einen biotechnischen Prozeß herstellbar sind.
12. Verwendung von sphärischen Mikropartikeln aus linearen, wasserunlöslichen Polysacchariden zur chromatographischen Trennung von Stoffgemischen.
13. Verwendung von sphärischen Mikropartikeln aus linearen wasserunlöslichen Polysacchariden als Adsorbens oder Filtermittel.
14. Trennmaterial enthaltend sphärischen Mikropartikeln aus chemisch und physikalisch unmodifizierten, wasserunlöslichen, linearen Polysacchariden und ggf. Hilf-, Zusatz- und/oder Trägerstoffe.
15. Trennmaterial nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikropartikel eine spezifische Oberfläche von 3 m<sup>2</sup>/g bis 10 m<sup>2</sup>/g besitzen.
16. Filtermittel und / oder Adsorbens enthaltend sphärischen Mikropartikeln aus chemisch und physikalisch unmodifizierten, wasserunlöslichen, linearen Polysacchariden und ggf. Hilf-, Zusatz- und/oder Trägerstoffe.
17. Verwendung des Trennmaterials nach einem der Ansprüche 1 bis 16 zur Abtrennung und gegebenenfalls Reinigung und Isolierung von biologischem Material aus Flüssigkeiten.
18. Verwendung nach Anspruch 17, worin das biologische Material eine Nukleinsäure ist.

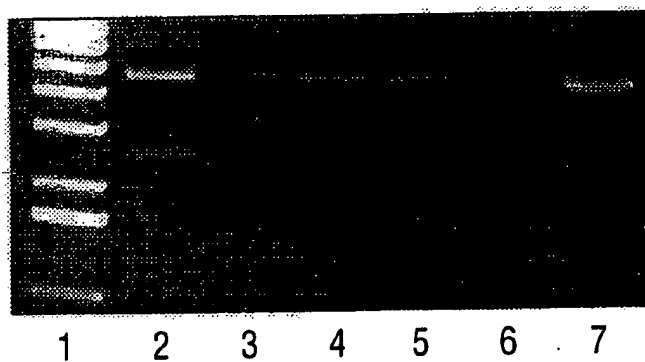
***Fig. 3***



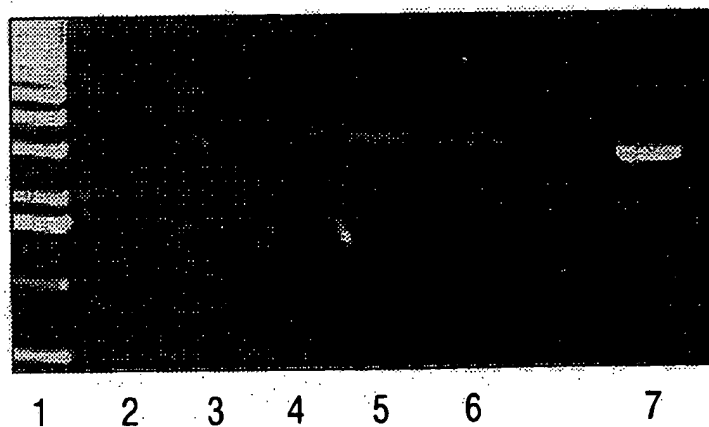
***Fig. 4***



**Fig. 5**



**Fig. 6**



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/00473

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 B01D15/08 G01N30/48 B01J20/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 B01D G01N B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 377 046 A (KANEBO LTD) 11 July 1990  see page 1, line 3-8  ---	1,12-14, 16,17
A	WO 95 05879 A (DOW CHEMICAL CO ;NICHOLSON LAWRENCE W (US); GORALSKI CHRISTIAN T ( ) 2 March 1995 cited in the application see the whole document  ---	1-18
A	WO 97 38018 A (PHARMACIA BIOTECH AB ;BERG HANS (SE)) 16 October 1997 see the whole document  -----	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 June 1999

Date of mailing of the international search report

21/06/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Persichini, C

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/00473

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0377046 A	11-07-1990	JP 2241547 A	26-09-1990
		JP 1254256 A	11-10-1989
		JP 1258739 A	16-10-1989
		JP 1966476 C	18-09-1995
		JP 6087973 B	09-11-1994
		DE 68908147 T	16-12-1993
		WO 8909651 A	19-10-1989
		US 5108596 A	28-04-1992
		US 5196527 A	23-03-1993
WO 9505879 A	02-03-1995	AU 7639994 A	21-03-1995
		DE 4496393 T	21-11-1996
		US 5641404 A	24-06-1997
WO 9738018 A	16-10-1997	AU 2417897 A	29-10-1997
		EP 0892815 A	27-01-1999

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00473

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 B01D15/08 G01N30/48 B01J20/22

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 B01D G01N B01J

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 377 046 A (KANEBO LTD) 11. Juli 1990 siehe Seite 1, Zeile 3-8	1,12-14, 16,17
A	WO 95 05879 A (DOW CHEMICAL CO ;NICHOLSON LAWRENCE W (US); GORALSKI CHRISTIAN T ( ) 2. März 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	1-18
A	WO 97 38018 A (PHARMACIA BIOTECH AB ;BERG HANS (SE)) 16. Oktober 1997 siehe das ganze Dokument	1-18

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. Juni 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

21/06/1999

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Persichini, C

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00473

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0377046 A	11-07-1990	JP 2241547 A	26-09-1990
		JP 1254256 A	11-10-1989
		JP 1258739 A	16-10-1989
		JP 1966476 C	18-09-1995
		JP 6087973 B	09-11-1994
		DE 68908147 T	16-12-1993
		WO 8909651 A	19-10-1989
		US 5108596 A	28-04-1992
		US 5196527 A	23-03-1993
WO 9505879 A	02-03-1995	AU 7639994 A	21-03-1995
		DE 4496393 T	21-11-1996
		US 5641404 A	24-06-1997
WO 9738018 A	16-10-1997	AU 2417897 A	29-10-1997
		EP 0892815 A	27-01-1999